

86

2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
CAMPUS IZTACALA

DETECCION DE SIDEROFOROS EN *Entamoeba histolytica*.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A
MIGUEL PALOMINO ANGELES

DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSE LUIS SANCHEZ SALAS.



LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MEXICO.

1998.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

268071



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mi madre Estela:

Por todo el cariño que me ha brindado, porque siempre me ha dado lo mejor, para que yo pueda seguir superándome. Por sus consejos y educación mi eterno agradecimiento.

A mis hermanos: Vicente, Loreto, Rafael, Elisa, Francisco, Fernando, Gilberto y Noé.

Por el apoyo incondicional, que siempre me han brindado.

Al Dr. José Luis Sánchez Salas:

Por el tiempo dedicado a este trabajo.

Al Dr. José de Jesús Serrano y al Pasante de Biología Alejandro Suárez:

Que amablemente donaron reactivos y prestaron equipo. En especial el Dr. Serrano que brindo asesoría para la realización de esta investigación.

A todos mis amigos por brindarme su amistad.

RESUMEN

Entamoeba histolytica es un organismo que tiene altos requerimientos de hierro para su desarrollo. Se ha demostrado que el éxito de una invasión amibiana esta relacionada con la disponibilidad de este metal en el medio. Muchos microorganismos patógenos con altas necesidades de hierro utilizan sideróforos para captar hierro. Debido a que el intestino grueso es un medio con baja disponibilidad de hierro, y a que existen similitudes en la regulación de la captación de hierro entre *E. histolytica* y *Escherichia coli*, este ultimo posee sideróforos, era muy probable que la amiba también los produciría. *E. histolytica* produce en respuesta a la activación con colágena tipo I y Ca^{++} Gránulos Electrodensos (GED), que ayudan a transportar varias moléculas asociadas a la patogenia del parásito; además contienen hierro, y este tal vez este asociado a un sideróforo.

Se realizaron cinéticas de activación con colágena tipo I y Ca^{++} de *E. histolytica* con una duración de 8 hrs, en solución Ringer como medio de mantenimiento bajo distintas condiciones. Por el ensayo del Croma Azuro S (CAS) se midió la concentración de hierro y se detectaron sideróforos en los sobrenadantes de los medios a intervalos de 2 hrs.

Posteriormente con el ensayo Csaky se detectaron hidroxamatos. El grupo experimental que contenía la solución Ringer Colágena, fue el que presentó las concentraciones más altas de hidroxamatos. Se obtuvieron (GED), y en estos se pudo detectar hidroxamatos, presumiblemente los GED participan en la liberación de los hidroxamatos al medio externo. La síntesis de GED e hidroxamatos es continua. Al igual que en otros microorganismos el aumento de la síntesis de sideróforos es estimulado por la baja disponibilidad de hierro. Este es el primer trabajo en el cual se reporta al menos químicamente la presencia de sideróforos en un protozooario. También se discute la probable participación del sideróforo en la patogenia del parásito.

DETECCION DE SIDEROFOROS EN *Entamoeba histolytica*.

INTRODUCCION	1
OBJETIVO	13
OBJETIVOS PARTICULARES	13
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	14
METODOLOGIA.	15
REMOCION DE HIERRO DEL MATERIAL DE LABORATORIO.	15
REMOCION DEL HIERRO DEL AGUA.	15
REMOCION DEL HIERRO DEL MEDIO.	15
CINETICA DE ACTIVACION DE <i>Entamoeba histolytica</i>.	16
CINETICA.	16
CULTIVOS DE <i>E. histolytica</i>.	16
SOLUCION RINGER.	16
CINETICA DE ACTIVACION.	17
PREPARACION DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES.	17
ENSAYO DE HIERRO.	19
OBTENCION DE GRANULOS ELECTRODENSOS (GED).	19
DETECCION DE SIDEROFOROS.	20
ENSAYO DEL CROMA AZUROL S (CAS).	20
FUNDAMENTO.	20
ENSAYO CAS PARA LA DETECCION DE SIDEROFOROS.	21
Preparación.	21
Detección de Sideróforos en Solución.	22
ENSAYO CSAKY.	22
FUNDAMENTO.	22
Reactivos.	23
Detección de Hidroxamatos.	23
LA MEDICION DE CONCENTRACION DE HIERRO.	24
RESULTADOS	26
SELECCION DE LAS CONDICIONES DE TRABAJO.	26
DETECCION DE HIERRO CON EL ENSAYO CAS.	26
ENSAYO CAS PARA LA DETERMINACION DE SIDEROFOROS.	28
ENSAYO CSAKY PARA LA DETECCION DE HIDROXAMATOS.	30
PROTEINAS EN GED.	34
DISCUSION	35
CONCLUSIONES	50
PERSPECTIVAS	52
REFERENCIAS	54

INTRODUCCION

La mayoría de los requerimientos de hierro para el desarrollo de plantas y animales son de aproximadamente 0.4 a 4 μM (Weinberg E.D. 1978).

Sin embargo existen excepciones, bacterias aeróbicas superiores como *Pseudomas*, *Aerobacter*, *Corynebacterium* y *Micobacterium*; y algunos anaerobios, por ejemplo: *Clostridium perfringens* y *C. pasterium*, tienen requerimientos de hierro inusualmente altos, estos fluctúan entre 18 a 50 μM para los aeróbicos y de 11 a 36 μM para los anaerobios (Diamond L.S. et al 1978).

El cuerpo humano tiene de 4 a 5 g de hierro, aproximadamente el 75% de éste, esta presente en la hemoglobina, parte del restante esta almacenado como ferritina y solo cantidades traza forman parte de moléculas como: Transferrina, Lactoferrina, Citocromos, etc.

El hierro tiene dos formas de oxidación: la ferrosa (Fe^{2+}) presente en medios anaeróbicos, y la férrica (Fe^{3+}) en medios aeróbicos. La forma ferrosa es más soluble que la férrica por lo que en entornos anaeróbicos la disponibilidad del hierro no es problema pero en ambientes aeróbicos la disponibilidad del hierro soluble es muy baja. Casi todos los organismos requieren hierro, los aerobios lo necesitan para la síntesis de citocromos y otros componentes de la cadena de transporte de electrones, mientras que los anaerobios lo

necesitan para la síntesis de ferredoxina y otras proteínas férricas sin grupo hemo con un bajo potencial de oxido reducción (Sánchez Salas J.L. 1990).

En el caso de los vertebrados y particularmente el hombre el hierro participa en muchos procesos fisiológicos; se combina con protoporfirina para el grupo hemo y enzimas importantes como la catalasa, citocromos, peroxidasas y enzimas que participan en la síntesis de DNA, lo que explica el porqué es un metal esencial para las células de casi todos los seres vivos.

Siendo el hierro un factor muy importante para casi todos los organismos vivos, algunos como los vertebrados, han desarrollado mecanismos de defensa específicos e inespecíficos para evitar la multiplicación de agentes infecciosos, dentro de los inespecíficos se encuentra el proceso inflamatorio, el sudor, etc., y entre ellos también se encuentra el proceso de disminución de la concentración de hierro, el cual se reduce a cantidades que no permitirían el crecimiento de microorganismos extraños en líquidos corporales o en mucosas (bacterias, hongos y quizás algunos protozoarios). Así la disminución de la concentración de hierro puede actuar como un mecanismo de defensa contra infecciones microbianas.

Un factor común y esencial en todas las infecciones es la capacidad del patógeno invasor de multiplicarse exitosamente en los tejidos del hospedero (Griffiths E. 1985). Se observó que animales de laboratorio a los cuales se les inyectó hierro en diferentes presentaciones, se hicieron mucho más susceptibles a la infección por una gran variedad de bacterias, incluyendo *Escherichia coli* comparándolos con los animales controles no tratados

(Griffiths E. 1985). Los compuestos de hierro pueden abolir los efectos antibacterianos de los fluidos del cuerpo in vitro. En general, el hierro afecta la susceptibilidad de los animales normales a la infección por reducción de la dosis letal de bacterias, por ejemplo: la dosis letal de *E. coli* en hámsters normales es de alrededor de 10^8 células, en contraste los hámsters inyectados con citrato férrico de amonio o compuestos tipo Hemo experimentan una reducción de hasta 10^3 células, lo que representa una baja de 100, 000 veces. Así ante un proceso infeccioso se ha observado una retención del hierro por el hospedero, activando los siguientes mecanismos: Incremento de la excreción de hierro endógeno tanto en orina, sudor y heces; decremento en la absorción intestinal del hierro exógeno; reducción del hierro en los compartimientos del plasma, con aumento del hierro almacenado; secreción de proteínas unidas al hierro en los sitios potenciales de invasión; incremento en la síntesis de proteínas del hospedero unidas al hierro. Estas observaciones dieron origen a la “Teoría de la Inmunidad Nutricional” postulada por Weinberg E. D. en 1984.

El hierro es esencial para el desarrollo de muchas bacterias, pero en un medio ambiente aeróbico este elemento es altamente insoluble y además escasamente disponible para muchos organismos.

Algunas bacterias utilizan directamente proteínas que contienen hierro como son: Transferrina, lactoferrina, o hemoglobina; otras tienen la capacidad de introducir hemo como tal. Otros microbios sintetizan y secretan sideróforos (Kühn S. et al 1996).

Los sideróforos se definen como un ligando virtualmente específico para el hierro (III), los cuales son de bajo peso molecular (500-1000 Daltones); son producidos por la bacteria para la solubilización extracelular y el transporte hacia el interior del patógeno vía receptores y transportadores específicos (Neilands J.B. 1981).

En general los sideróforos pueden ser clasificados como hidroxamatos o Fenolatos-Catecolatos (Fig.1).

R = H, OH.
X = O, N.

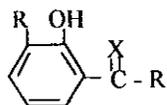
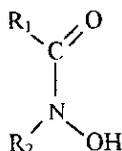
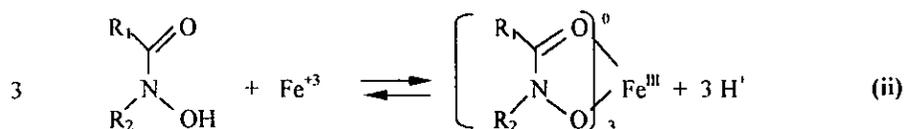
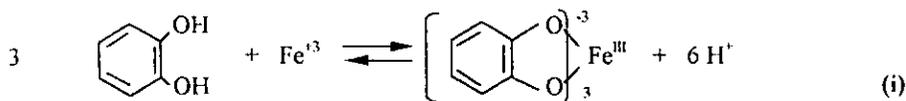


Figura 1. Grupo Funcional de Hidroxamatos.

Los hidroxamatos son hidroxilaminas orgánicas aciladas, que presentan el siguiente grupo funcional:



Podemos decir que a valores de pH no ácido los catecoles son los ligandos más fuertes para el hierro (III), superando a los hidroxamatos. Los catecoles pueden ser mejores ligandos, pero tienen el inconveniente de que son susceptibles a oxidaciones avanzadas, propiedad que no presentan los hidroxamatos, estos son más estables. Los hidroxamatos son capaces de formar complejos no cargados (ecuación ii), a diferencia de los catecoles (ecuación i)



Debido a su alto spin, los iones férricos octaedrales, son más efectivamente quelados por tres ligandos bidentados que contienen oxígeno (Fig. 2). En muchos casos los ligandos bidentados están incorporados a la misma molécula (Miller M.J. 1989)

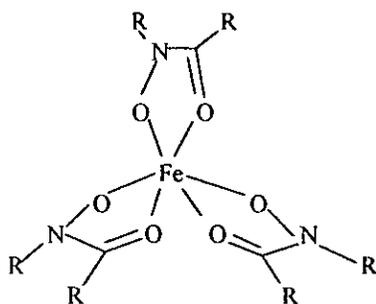


Figura 2. Unión del hierro (III) a tres grupos hidroxamato

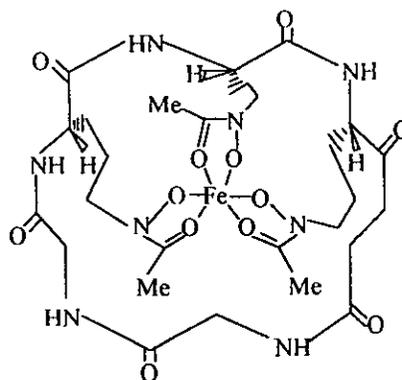


Figura 3. Sideróforo Ferricromo.

Las pioverdinas forman una familia de compuestos que son intermediarios entre los usualmente estrictos sideróforos Catecolatos o hidroxamatos. Las Pioverdinas son fuertes queladores del Fe(III), tienen un derivado denominado 2, 3 diamino-6, 7 dihidroquinolina (cromóforo), que confiere color y fluorescencia a la molécula, la cual está unida a un pequeño péptido. Una tercera parte de la molécula, usualmente está formada por un grupo succinamina unido a un grupo derivado de la quinolinona. La quelación del Fe(III) involucra

al grupo catecolato del cromóforo y las dos funciones hidroxamato derivadas de los dos residuos hidroxiaminoacil de la cadena peptídica (Hohnadel D. y Meyer J.M. 1988).

Existen otros compuestos como el citrato y otros hidroxiaácidos que no son ni fenolatos ni hidroxamatos, que sirven para transportar hierro a la bacteria y que se podrían considerar como sideróforos de afinidad intermedia (para mayor información ver tesis de examen predoctoral Sánchez Salas J.L. 1990).

Algunos sideróforos tienen la capacidad de remover hierro de proteínas asociadas al hierro y esta característica ha sido relacionada con la virulencia del patógeno (Payne S.M. 1994).

Para la eficiente entrada de sideróforos férricos, el microorganismo ha desarrollado sistemas de entrada altamente específicos para sus propios sideróforos y también para algunos sideróforos exógenos. Todos los sistemas de entrada de sideróforos de bacterias Gram negativas, involucran un receptor de membrana externa y un sistema de transporte periplásmico dependiente de una proteína de unión que consiste de una proteína periplasmática, un componente integral de membrana y una ATPasa unida a la membrana que provee energía. Una vez que el sideróforo entra a la célula, el hierro es liberado por reducción a Fe(II) completando el proceso (Kühn S. et al 1996).

A continuación se presentan algunos ejemplos de la relación de los sideróforos con la capacidad de infección. En *Escherichia coli* se ha encontrado una relación entre la virulencia

de cepas bacterianas y la producción del sideróforo aerobactina (Montgomerie J. Z. et al 1984). Varios miembros del género *Pseudomonas* son importantes en nutrición de plantas y patología humana, todos producen sideróforos conocidos como pseudobactinas, pioverdinias o azobactinas (Neilands J.B. 1994a). La virulencia esta claramente asociada con la asimilación de hierro en *Vibrio anguillarum*, el agente causal de la septicemia hemorrágica letal de peces salmónicos: Esta bacteria tiene un sistema de captación del hierro de alta afinidad que utiliza el sideróforo anguibactina (Neilands J.B. 1994b).

En *Vibrio cholerae* se ha observado que la capacidad de colonización del intestino, está relacionada con el buen funcionamiento de sus dos sistemas de captación de hierro: La utilización de Hemo y el sistema de entrada del sideróforo vibriobactina (Henderson D.P. y Payne S.M. 1994).

Generalmente cuando un parásito como las bacterias tienen éxito en la infección y posterior producción de la enfermedad, es debido a que posee junto con sus factores de virulencia un sistema de alta afinidad (sideróforos) para el Fe(III).

Entamoeba histolytica, es un parásito que afecta al 10% de la población mundial, es el agente causal de la amibiasis invasora, que se caracteriza por la destrucción e invasión de la mucosa colónica por trofozoítos. *E. histolytica* también tiene el potencial de causar infecciones extra intestinales (Kretschmer R.R. 1994).

E. histolytica es un organismo que tiene altos requerimientos de hierro para su desarrollo, Lautour N. G. y Reeves R. E. (1965) probaron que era posible cultivar la cepa DKB a niveles de hierro abajo de $12 \mu\text{M}$, sin embargo estos autores no hacen referencia a la concentración que produce el máximo desarrollo, los datos que ellos presentan sugieren que se sitúa alrededor de $44 \mu\text{M}$.

El hierro ha sido encontrado en los Trofozoítos de *E. histolytica* presente en enzimas como la diaforosa, proteínas hierro sulfuro, ferredoxinas y superóxido dimutasas, a través de ellas se puede dar una vía oxidativa para el metabolismo de la amiba en ausencia de un sistema de citocromos (Smith J.M. y Meerovitch E. 1982).

Se tiene conocimiento de que la infección por *E. histolytica* se produce por la ingestión de quistes maduros, y el desenquistamiento ocurre en la región inferior del intestino delgado, y rápidamente el metacisto se divide para dar origen a ocho pequeñas amibas, estas penetran en el intestino grueso y pueden invadir los tejidos del huésped (Zama V. 1982). Debido a que el pH presente en el intestino delgado y grueso, tiene un intervalo de 6.89 - 7.51 (Schultz S. G. et al 1989), y estos pHs, el hierro está en un estado de oxidación de +3, este es muy insoluble en este medio; además de que normalmente el hierro se puede unir a proteínas como la lactoferrina presente en las secreciones del intestino, por lo tanto el hierro libre solubilizado, baja aun más (Neilands J. B. 1984), esto sumado, a que en un proceso infeccioso provoca que el hospedero retenga la mayor parte del hierro que pudiera usar el patógeno (Weingberg E.D. 1984), dando como resultado, que por lo menos

en las primeras etapas de la infección, la disponibilidad de hierro para *E. histolytica* sea muy baja.

A continuación citaremos algunos ejemplos de la relación existente entre el proceso de invasión de *E. histolytica* y la disponibilidad de hierro.

Estudios realizados en el Hospital General del Centro Medico Nacional del IMSS con pacientes afectados por absceso hepático amibiano (Diamond L.S. et al 1978) demostraron que los niveles de hierro en suero de los pacientes, era aproximadamente la mitad de los presentes en individuos sanos; en cuanto a la capacidad de unión total al hierro (CUTH) y el porcentaje de saturación de la transferrina eran tres veces menos que la presente en los controles. Diamond y colaboradores sugieren que la amiba al invadir la pared del intestino grueso provoca que el hospedero desencadene un estado de hipoferremia dando lugar a una movilización del hierro hacia el hígado; sin embargo la amiba puede entrar a la circulación sanguínea a través de la erosión de vénulas y viajar al hígado donde nuevamente existen condiciones favorables para la invasión, por lo tanto esta respuesta protectora resulta en un detrimento de la salud del hospedero.

Elsdon-Dew R. y colaboradores (1949) realizaron investigaciones en poblaciones Zulúes en Duban Sudáfrica, en las cuales eran muy frecuente y severa la disentería amibiana fulminante, especialmente en adultos jóvenes. Los investigadores descubrieron una alta incidencia de siderosis entre los Zulúes, la cual fue asociada a una dieta compuesta principalmente por cereales y a la entrada de hierro iónico proveniente del hábito de cocinar

y comer en utensilios fabricados de hierro, además eran comunes elevados índices de hierro en suero y una alta CUTH, también se encontraron depósitos anormales de hierro en el hígado. Debido a que se tiene conocimiento de la susceptibilidad de los humanos a patógenos bacterianos y hongos cuando sus niveles de hierro son elevados, ellos no dudaron en relacionar la siderosis de los Zulúes con la severidad y frecuencia de la amibiasis.

Cómo podemos ver *E. histolytica* tiene elevadas necesidades de hierro y el éxito de una invasión amibiana entre otros factores, esta relacionado con la disponibilidad de este metal en el medio, ¿Será posible que *E. histolytica* necesite sistemas de captación de hierro de alta afinidad (Sideróforos)?.

La capacidad de los trofozoitos de *E. histolytica* para destruir tejidos humanos durante la invasión amibiana, ha sido atribuida principalmente a la producción de sustancias citolíticas o hidrolíticas, sin embargo, otros estudios han sugerido la participación de proteínas amibianas que forman canales iónicos en la membrana de la célula blanco (Leippie M. et al 1991 y 1993), enzimas proteolíticas como las cistein-proteinasas (Monfort I. et al 1993) y metaloproteinasas como la colagenasa que digiere la colágena tipo I (Muñoz M.L. et al 1982).

Debido a que la colágena es uno de los mayores componentes de la matriz extracélular en tejidos humanos, la colagenasa de *E. histolytica* ha sido considerada como un factor importante en la patogenicidad del parásito. Esta actividad esta asociada con los gránulos electrodensos (GED) que tienen un diámetro entre 80 y 200 nm, y son secretados

hacia el espacio extracelular en respuesta a la interacción de los trofozoitos con colágena tipo I y Ca^{2+} (Muñoz M.L. et al 1990 y 1994). Se tiene establecido que los GED son complejos densos desprovistos de membrana, formados por polipeptidos catiónicos, los cuales presentan varias actividades proteolíticas; el espectro de rayos X obtenido de GED purificados reveló que contenían los siguientes elementos: Na, Mg, S, Cl, K, Ca; además de Hierro (León G. et al 1997). Debido a que los GED participan en la liberación de polipéptidos al espacio extracelular y como el hierro es uno de sus componentes, ¿Existirán posibilidades de que el hierro este asociado a algún péptido, el cual pueda ser considerado como un Sideróforo?

Bruchhaus y Tannich (1994) al estudiar la regulación de la expresión de la superoxido dismutasa (SOD) en *E. histolytica*, encontraron que había un incremento sustancial de la expresión de la SOD en condiciones limitantes del ion ferroso; que toda la actividad SOD puede ser atribuida a un tipo de hierro unido (FeSOD); que la expresión FeSOD es regulada a nivel transcripcional y ,finalmente, en la región 5' del gen FeSOD de amiba, había un fragmento de 19 pb similar al motivo consenso del sistema de regulación de captación de hierro de *E. coli*. Ellos concluyeron que había similitudes en la regulación del hierro en *E. coli* y *E. histolytica*.

Tomando en cuenta esto último, y como se tiene conocimiento de que *E. coli* produce en respuesta a la reducción del hierro en el medio, los sideróforos enterobactina (O'Brien I.G. y Gibson F. 1970) y aerobactina (Stuart S.J. et al 1980), ¿*E. histolytica* en respuesta a la reducción de la concentración de hierro, también producirá sideróforos?

Actualmente no se ha reportado la presencia o producción de algún compuesto de alta afinidad (sideróforo) que sea producido por este protozooario o algún otro patógeno de este tipo y nuestro trabajo se encamina para tratar de detectar algún compuesto de esta clase.

Para tratar de contestar estas preguntas se planteó el siguiente objetivo y estrategia experimental

OBJETIVO

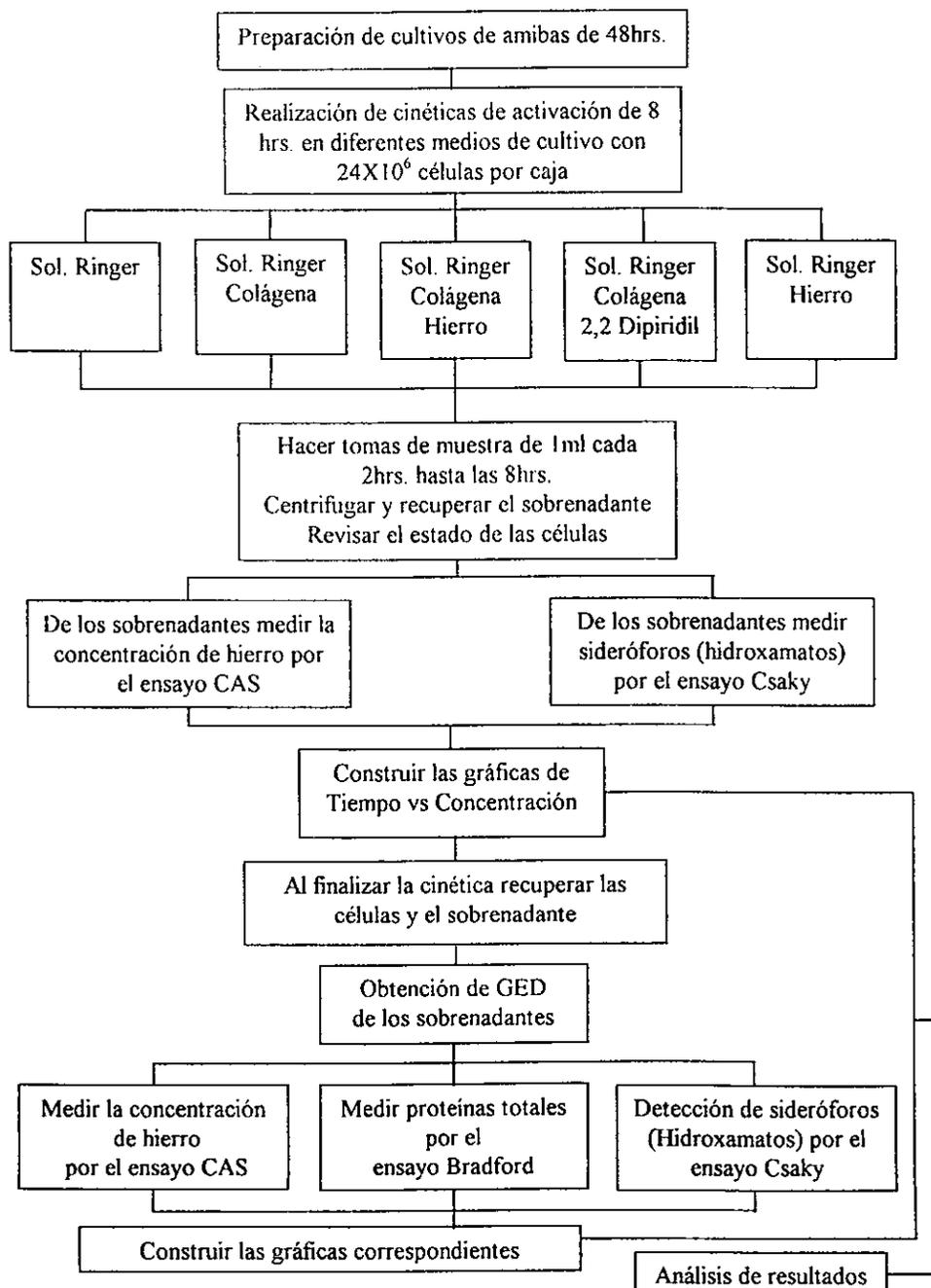
-Investigar la presencia de Sideróforos en *Entamoeba histolytica* HM-1: IMSS en diferentes condiciones de cultivo.

OBJETIVOS PARTICULARES

-Realización de cinéticas de activación con colágena tipo I y calcio, en presencia de diferentes medios de cultivo.

-Detección de hierro y sideróforos en sobrenadantes de cultivos y en Gránulos Electrodensos (GED).

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



METODOLOGIA

REMOCION DE HIERRO DEL MATERIAL DE LABORATORIO.

El vidrio es una superficie con un notorio intercambio iónico. Por lo cual se pueden tener grandes problemas por este hecho, ya que estas superficies continuamente se contaminan con hierro.

Para eliminar esta contaminación se usó HCl diluido al 50 % y fue colocado el material en esta solución por espacio de 24 hrs. Se puede usar agua regia o EDTA 50 mM en vez de HCl.

Después de 24 hrs se enjuagaba con agua bidestilada 10 veces.

REMOCION DEL HIERRO DEL AGUA.

El método más común para remover el hierro del agua es la destilación. El agua destilada y bidestilada fueron guardadas en contenedores de plástico por un período de 1 semana. El agua y los medios para estudios de hierro controlado o bajo se esterizaron por filtración más que por autoclave.

REMOCION DEL HIERRO DEL MEDIO.

Para desferrar los medios se utilizo el compuesto 2,2 Dipiridil, que es un quelador del hierro, en una concentración de 0.15 mM; para desferrar el medio se esperaron 24 hrs.

Para remover el hierro de la colágena, se utilizó Chelex 100 el cual es un estireno divinilbenceno copolímero producido por Bio-rad, la resina fue colocada en proporción del 10 % y se agitó por espacio de 2 hrs a 4° C.

CINETICA DE ACTIVACION DE Entamoeba histolytica.

CINETICA.

Una de las maneras usadas para poder detectar la presencia de sideróforos en bacterias es el crecimiento de cultivos en medios pobres en hierro, acompañados con la toma de muestras de sobrenadantes en distintos tiempos, midiendo en éstos la concentración de hierro y graficando contra el tiempo. En los tiempos en los cuales existan bajas en la concentración de hierro, se presume la existencia o producción de sideróforos, posteriormente se procede a la confirmación con un ensayo de detección de sideróforos. Esta forma de detección de sideróforos se aplicará a *E. histolytica*, para lo cual, se realizaron los ensayos que a continuación se mencionan.

CULTIVOS DE *E. histolytica*.

Los trofozoítos de *E. histolytica* HM-1: IMSS se cultivaron en el medio TYI-S-33. Todos los experimentos se llevaron a cabo usando trofozoítos después de 48 hrs de cultivo.

SOLUCION RINGER.

La solución Ringer fue seleccionada como medio de mantenimiento de amibas debido a que es fácil controlar su concentración de hierro, además por su baja concentración

de hierro se puede usar para lavar las células y eliminar el medio de cultivo; es una solución transparente, evitando con esto que interfiera con los ensayos espectrofotométricos, y mantiene a las amibas en buen estado aproximadamente 8 hrs, el cual es tiempo suficiente para poder detectar cambios en las cinéticas.

La solución Ringer que se utilizo tenía la siguiente composición:

Cloruro de sodio	9.000 g
Cloruro de potasio	0.042 g
Cloruro de calcio	0.025 g

La solución fue aforada con agua desionizada a 1000 ml. y se almaceno en botellas de plástico o envases de vidrio sin hierro, y solo se preparo en el momento en el cual se utilizo.

CINETICA DE ACTIVACION.

PREPARACION DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES.

Antes de iniciar el experimento se obtuvieron 288×10^6 células, una vez obtenidas, se dividieron en grupos de 24×10^6 células por botella, para un total de 12 botellas y 6 condiciones experimentales (2 repeticiones para cada una). A continuación se mencionan los pasos realizados.

Para obtener el número deseado de amibas se necesitan aproximadamente 36 botellas de cultivo (75 cm^2) confluentes, se tuvo cuidado de que las células estuvieran en buen estado y no existiera contaminación. Para despegarlas se colocaron en hielo (por un periodo no mayor de 5 minutos).

Las células una vez despegadas, fueron centrifugadas a 1,300 rpm/3 minutos (trabajando en condiciones de esterilidad) y se desecho el medio.

Las células se resuspendieron en 50 ml. de solución Ringer y nuevamente se centrifugaron a 1300 rpm/3 minutos, al final se desecho el sobrenadante y nuevamente se repitió este paso.

Posteriormente todas las células fueron resuspendidas en 20 ml. de solución Ringer (Volumen final) y estas se contaron en una cámara de Neubauer, verificando que el número de células era de 288×10^6 , en caso contrario se disminuyó o aumento el número de células.

Terminando esto, se procedió a hacer los grupos experimentales registrados en la Tabla I, recordando que cada botella tiene 24×10^6 células.

TABLA I
CONTENIDO DE LAS BOTELLAS EN LA CINETICA DE ACTIVACION

*GRUPO	Sol. Ringer	Colágena	FeCl ₃	2,2-Dipiridil
1	30 ml	---	---	---
2	30 ml	9 mg	---	---
3	30 ml	9 mg	1 mM**	---
4	30 ml	9 mg	---	0.15 mM**
5	30 ml	---	1 mM**	---
Control	30 ml	9 mg	---	---

*Cada grupo esta formado por dos botellas.

**Concentración final presente en cada botella.

ENSAYO DE HIERRO.

Una vez que los grupos experimentales estuvieron listos, se realizo un ensayo de 8 hrs., durante este se llevaron a cabo tomas de muestra (1 ml. de cada botella) en intervalos de 2 horas, después de obtener la muestra, inmediatamente se centrifugo a 5000 rpm/5 minutos para eliminar células y restos celulares grandes; se recupero el sobrenadante y fue centrifugado a 13,000 rpm/5 minutos para eliminar restos celulares y colágena. Cada uno de los sobrenadantes obtenidos se guardo a -20 °C.

Los sobrenadantes fueron utilizados para detectar Fe y sideróforos por el ensayo CAS, además de detectar hidroxamatos por el ensayo Csaky, como se describirá posteriormente.

Cuando termino el ensayo (pasadas 8 hrs.) se colocaron las botellas en hielo y se despegaron las células, después se centrifugaron los medios a 1,300 rpm/3 minutos, los sobrenadantes fueron guardados en refrigeración y las células fueron contadas por cámara de Neubauer, y finalmente estas se guardaron a -70 °C.

OBTENCION DE GRANULOS ELECTRODENSOS (GED).

Para obtener los GED de los sobrenadantes obtenidos al final del ensayo, éstos fueron centrifugados 2 veces a 3000 rpm por 10 minutos, o cuantas veces era necesario, para eliminar todos los contaminantes que no son gránulos (observar al microscopio una gota). Y finalmente, se centrifugaron a 10,000 rpm por 15 minutos para obtener los GED, resuspendiendo éstos en solución Ringer.

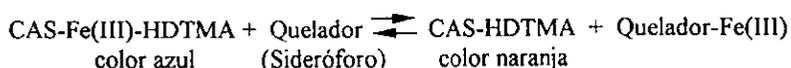
Una vez obtenidos los GED se determinaron proteínas totales utilizando el ensayo Bradford (Bradford M.M. 1976), se medieron hierro y sideróforos por CAS y se detectaron hidroxamatos por el ensayo Csaky, una vez obtenidos estos datos, se graficaron los resultados correspondientes.

DETECCION DE SIDEROFOROS.

ENSAYO DEL CROMA AZUROL S (CAS).

FUNDAMENTO.

Es un método químico, que aprovecha la propiedad de que el compuesto formado por CAS-Fe(III)-HDTMA, al perder el Fe(III) pasa del color azul al naranja. Si este compuesto es adicionado en solución tiñe la solución de color azul, si agregamos a la solución un compuesto quelante (sideróforo) este va atrapar el Fe(III) del compuesto y como resultado la solución cambia a color naranja.



El método es independiente de la estructura y para ligandos fuertes como los sideróforos. Los ligandos débiles sólo reaccionan cuando están presentes en gran cantidad.

Para calcular la concentración de sideróforos se mide la absorbancia a 630 nm, una vez que se alcance el equilibrio. La mayoría de los sideróforos reaccionan en proporción de 1:1 con el complejo CAS-Fe(III)-HDTMA.

El indicador es un compuesto de estructura desconocida formado por CAS-Fe(III)-HDTMA (Figura 3), que tiene un coeficiente de extinción de aproximadamente $100,000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 630 nm y pH 5.6.

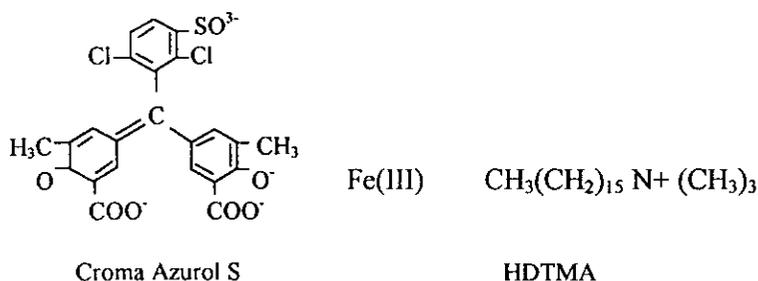


Figura 3. Componentes del compuesto ternario CAS-Fe-HDTMA de estructura desconocida.

ENSAYO CAS PARA LA DETECCIÓN DE SIDEROFOROS.

(Schwyn B. y Neilands J.B.)

Solución Ensayo de Croma Azurol S (CAS).

Reactivos.

1. Hexadecil Trimetilamonio Bromuro (HDTMA) SIGMA.
2. $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ MERCK.
3. Piperazina Anhidra SIGMA.
4. Acido Clorhídrico concentrado.
5. Croma Azurol S (CAS), SIGMA.

Preparación.

6 ml de HDTMA 10 mM se colocaron en un matraz volumétrico de 100ml y se diluyeron con agua, después se adiciono lentamente y bajo agitación 1.5ml de una solución de hierro (1 mM de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ y 10 mM de HCl) y 7.5 ml de CAS acuoso 2 mM. Posteriormente 4.307 g de Piperazina anhidra se disolvieron en agua, ajustando el pH con

HCl concentrado ayudados del potenciómetro, esta solución amortiguadora ($\text{pH} = \text{pK} = 5.6$) se agregó al matraz volumétrico que contenía la solución CAS y fue aforado con agua a 100 ml. La solución se almacena en la oscuridad y fue guardada en frascos de polietileno de color café.

Detección de Sideróforos en Solución.

Se tomó una alícuota de 0.5 ml de solución de sideróforos o sobrenadante y fue mezclada con 0.5 ml de sol. ensayo CAS. Una referencia fue preparada usando exactamente los mismos componentes excepto el sideróforo por ejemplo el medio no inoculado, usado para el cultivo. Después de alcanzar el equilibrio la absorbancia fue medida a 630 nm.

ENSAYO CSAKY.

FUNDAMENTO.

Este ensayo fue utilizado para la detección de sideróforos del tipo hidroxamato, y es más sensible que el ensayo del perclorato férrico. Como los ácidos hidroxámicos son hidroxilaminas orgánicas aciladas, la digestión de la muestra en ácido sulfúrico y su oxidación con yodo a ácido nitroso fue introducida por Csaky para la detección de la hidroxilamina unida. La prueba es sensible ya que el ácido nitroso es diazotizado y acoplado a 1-naptilamina para producir un complejo conjugado fuerte, e intensamente coloreado. La reacción depende de la liberación de hidroxilamina y desde que todos los sideróforos hidroxamato son de variedades secundarias, la hidroxilamina N está unida a una cadena de carbono, aquí hay un pequeño misterio en cómo ocurre esto. La presencia de un grupo alfa

amino y una cadena larga, favorece su ciclicación y potencialmente regula la producción de una función aldehído.

Para darnos una idea de la concentración de hidroxamatos en los sobrenadantes de los grupos experimentales obtenidos en cada tiempo realizamos lo siguiente:

Se uso un blanco que entro a todo el proceso del ensayo, el cual era agua desionizada y se prepararon estándares a distintas concentraciones con el sideróforo desferal, midiendo las absorbancias y haciendo una curva patrón se puede conocer la concentración de los problemas.

También se graficaron las concentraciones de los problemas con el tiempo, para ver como se comportaban.

Reactivos.

- Ácido sulfanílico: 1 g de ácido disuelto por calentamiento en 100 ml de ácido Acético al 100 % (v/v).
- Solución de yodo: 2 g de Na_3AsO_4 en 100 ml de agua.
- Acetato de sodio: 35 g de acetato de sodio en 100 ml de agua.
- Solución de α -naptilamina: 3 g de α -naptilamina disueltos en 1,000 ml de ac. Acético al 30 %.

Detección de Hidroxamatos.

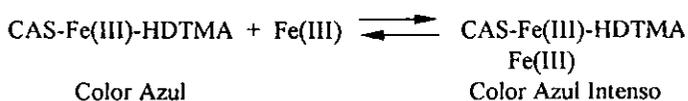
50 μl de solución de sideróforo o sobrenadante fueron hidrolizados en 59 μl de H_2SO_4 6N, en nuestro caso la única modificación que realizamos fue que incubamos a 65 °C por 1 hora, esto fue por un fin practico, ya que la temperatura del ensayo era el doble, y

como verificamos con el sideróforo desferal que no se afectaba el ensayo, decidimos utilizar esta temperatura.

La solución era entonces regulada por adición de 150 μ l de solución de acetato de sodio. Se colocaron 50 μ l de ácido sulfanílico seguido por 25 μ l de solución de yodo. Después de 3 a 5 minutos , el exceso de yodo fue destruido con 50 μ l de solución de arsenito de sodio y se adicionaron 50 μ l de solución de naptilamina. El volumen fue aforado con agua a 500 μ l, y se espero el desarrollo de color de 20 a 30 minutos, y después se medio la absorbancia a 526 nm.

LA MEDICION DE CONCENTRACION DE HIERRO.

Fue aprovechada la propiedad de que el compuesto formado por CAS-Fe-HDTMA al incorporar más Fe(III) va a adquirir un tono azul intenso.



Para calcular la concentración de hierro de los problemas se midió la absorbancia a 630 nm y se construyo una curva patrón de hierro y usando un blanco con CAS agua desionizada, de esta manera se conoce la concentración de hierro de los problemas. Un volumen de la solución CAS reacciona con un volumen de la solución problema, lo mismo que los estándares de hierro.

El método nos permitió medir hasta una concentración de 1 mM, concentraciones mayores provocan que el reactivo precipite.

Con los datos obtenidos de la concentración de hierro con respecto del tiempo se graficaron los distintos grupos experimentales mencionados anteriormente, y se detectó donde existen bajas en la concentración de hierro.

RESULTADOS

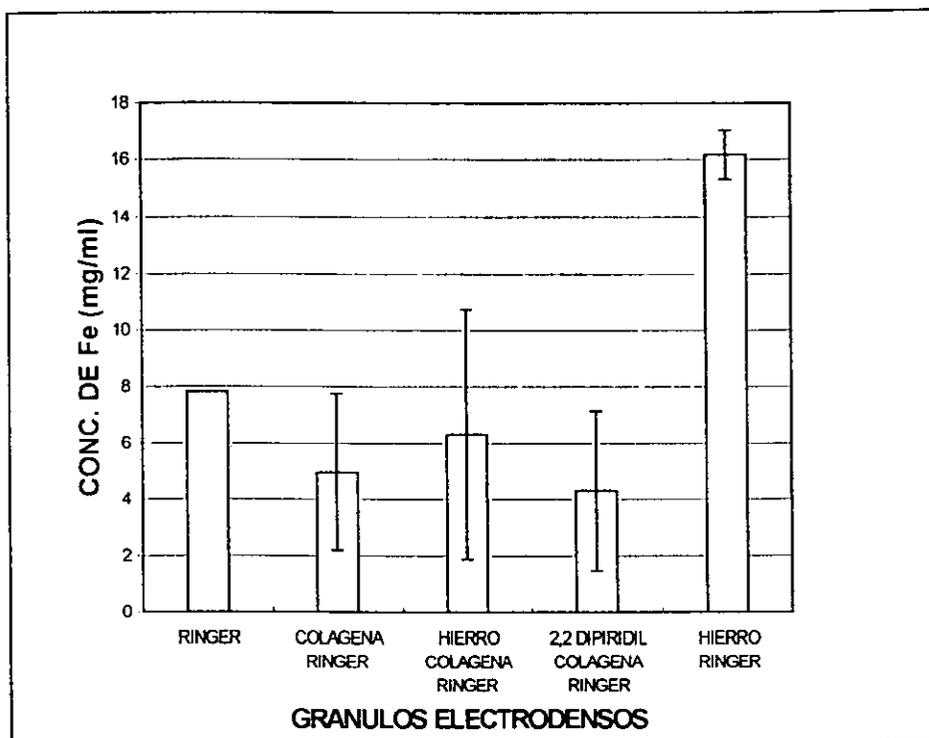
SELECCION DE LAS CONDICIONES DE TRABAJO.

De los grupos experimentales, los que mejor conservaban las células, eran los grupos Ringer-Colágena (Ri-Co) y el Ringer-Colágena-Hierro (Ri-Co-Fe). El grupo Ringer (Ri) y el grupo Ringer-Hierro (Ri-Fe) conservaban bien las células. En cambio el grupo de Ringer-Colágena-2,2 Dipiridil (Ri-Co-Dip), presentó una alta mortalidad.

DETECCION DE HIERRO CON EL ENSAYO CAS.

Se graficaron las concentraciones de hierro de los sobrenadantes de los medios de cultivo con respecto al tiempo, utilizando el ensayo CAS, tal como se indicó anteriormente; pero notamos que las gráficas obtenidas en varias cinéticas no proporcionaban indicios de algún tipo de comportamiento regular, de hecho, este tipo de pruebas sólo indicaba que era poco probable la existencia de alguna molécula captadora de hierro, que provocará bajas en la concentración de hierro de los medios; el proyecto no se abandonó debido a que al utilizar el ensayo CAS para detectar sideróforos, este indicaba la existencia de estos compuestos, además de que el ensayo Csaky también proporcionó indicios de la presencia de sideróforos.

A pesar de que el ensayo CAS para la detección de hierro no fue el método más apropiado para cuantificar las concentraciones de hierro en los sobrenadantes de las cinéticas, si fue posible obtener resultados confiables al aplicar la prueba para la



Gráfica 1. Comparación de los promedios de la concentración de hierro en GED de dos cinéticas de activación de *Entamoeba histolytica*.

detección de hierro a los GED obtenidos de los distintos grupos experimentales al final de la cinética, recordando que los GED previamente eran resuspendidos en solución Ringer. Se promediaron los resultados de las concentraciones de hierro en GED de dos cinéticas (Gráfica 1) y estos indicaban que aparentemente existían diferencias entre los grupos experimentales, para confirmar se aplicó una prueba de anova de un factor con un nivel de significancia (α 0.05) y esta nos indicó que los grupos Ri, Ri-Co, Ri-Co-Fe y Ri-Co-Dip, no representaban diferencias significativas con respecto a las concentraciones de hierro, la concentración promedio fue de 4.7 mg/ml de hierro; en cambio el grupo Ri-Fe fue significativamente diferente a todos los demás grupos.

ENSAYO CAS PARA LA DETERMINACION DE SIDEROFOROS.

Se aplicó el ensayo CAS descrito previamente, a las muestras obtenidas en la cinética de activación, en ninguna muestra observamos un cambio de color hacia naranja o amarillo, lo que significa una prueba negativa para sideróforos (Schwyn B. y Neilands J.B. 1987). Sin embargo algunas muestras presentaban una coloración rosada tendiendo hacia violeta y su absorbancia a 630 nm era cero, por ejemplo las muestras del grupo Ri-Co-Dip, debido a esto, y conociendo que el 2,2 Dipyridil es un agente quelador del hierro, y el ensayo CAS se basa en un cambio de color vía la liberación del hierro que contiene, decidimos montar una prueba cualitativa, usando como estándar el sideróforo Desferal a distintas concentraciones, en un intervalo de 0.004 a 10 mM y la misma prueba se aplicó a la 8-hidroxiquinoleína. Para nuestra fortuna al poner a reaccionar estos estándares con el

reactivo CAS (Tabla II), estos iban disminuyendo la tonalidad azulada hacia un tono rosado tendiendo a violeta, precisamente varias de estas tonalidades se presentaron en los grupos Ri, Ri-Co y Ri-Co-Dip, presumiblemente existía producción de sideróforos. Schwyn B. y Neilands J.B. para demostrar la universalidad del ensayo de CAS probaron varios sideróforos, todos dieron pruebas positivas al cambiar de tonalidades azules a naranjas y midieron la absorbancia a 630 nm, con estos resultados graficaron la absorbancia contra la concentración y observaron que la absorbancia disminuye conforme aumenta la

TABLA II

TONALIDADES PRESENTADAS POR EL SIDEROFORO DESFERAL A DISTINTAS CONCENTRACIONES EN UN ENSAYO CAS.

	*0.004	0.02	0.07	0.15	0.25	0.50	1.00	10.00
Tonalidad Azul	+	+	+	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+	+	+
			+	+	+	+	+	+
				+	+	+	+	+
					+	+	+	+
						+	+	+
							+	+
								+
								+

Tonalidad Rosa

* Las concentraciones están dadas en (mM).

concentración, presentando un comportamiento lineal; las concentraciones que utilizaron estaban en un intervalo de 0 a 0.015 mM, en cambio nuestras concentraciones son más elevadas, alrededor de 0.004 a 10 mM. La gráfica presentada por los autores, debido a su comportamiento lineal permite predecir que tendremos absorbancia de cero a concentraciones de 0.019 mM aproximadamente; se aplicó el ensayo CAS para la detección de sideróforos en las muestras, al medir la absorbancia las tonalidades rosadas siempre tenían absorbancia, cero, y en la prueba cualitativa aplicada al desferal las concentraciones correspondientes a esta tonalidad estaban en un intervalo de 0.15 a 10 mM siendo más altas que 0.019 mM (Tabla II), por lo tanto se cumple lo que en teoría se esperaba.

ENSAYO CSAKY PARA LA DETECCION DE HIDROXAMATOS.

Una vez que se aseguró que en el ensayo CAS existía la posibilidad de encontrar sideróforos, utilizamos dos pruebas más específicas, para identificar el tipo de sideróforo.

Estas fueron el ensayo Arnow que detecta catecolatos (Arnow L. E. 1937) y el ensayo Csaky que detecta hidroxamatos. Con respecto al ensayo Arnow todas las pruebas fueron negativas, y no hay un sideróforo del tipo catecol.

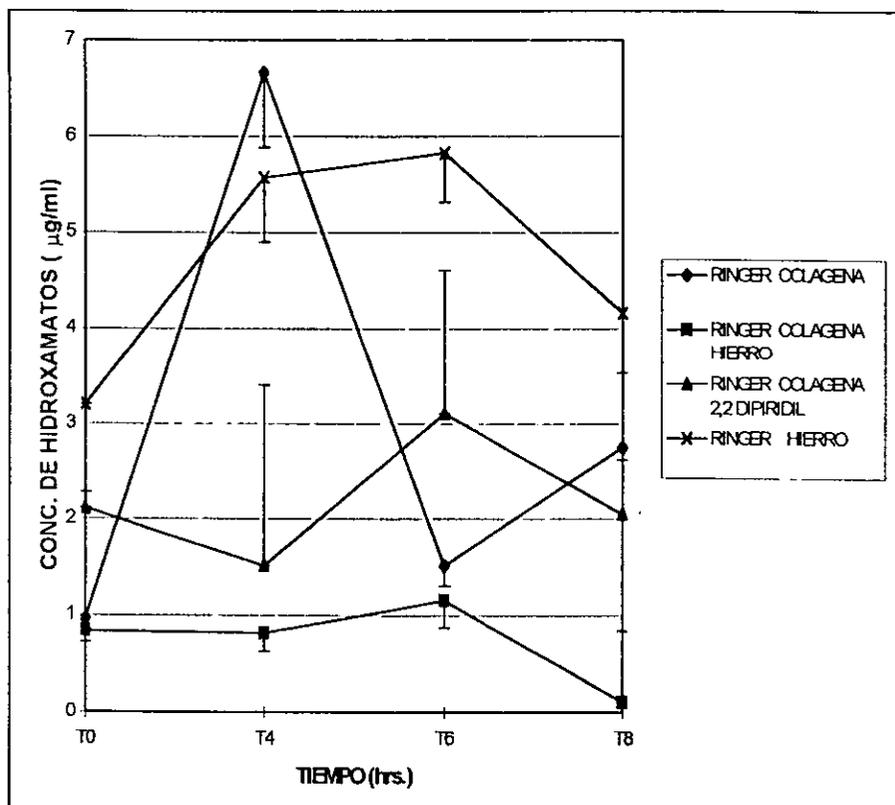
En las pruebas del ensayo Csaky, se obtuvieron resultados positivos, y se cuantificó de manera aproximada la concentración de hidroxamatos, tomando las consideraciones de Gillan A. H., Lewis A. G. y Andersen J. 1981, el cual es un análisis semicuantitativo. Y construimos las gráficas de tiempo contra concentración de hidroxamatos.

Todos los grupos dieron pruebas positivas, entre ellos destacaba el de Ri-Co (Gráfica 2) este muestra un notable incremento en la concentración de hidroxamatos a las 4 horas , también el grupo Ri-Fe presentó altas concentraciones de hidroxamatos teniendo sus valores más altos a las 4 y 6 horas. Podemos considerar que el grupo Ri-Co-Fe se mantiene mas o menos constante; el grupo Ri-Co-Dip tiene su máxima concentración a las 6 horas. En general podemos mencionar que todos los grupos a las 6 horas bajan sus concentraciones de hidroxamatos.

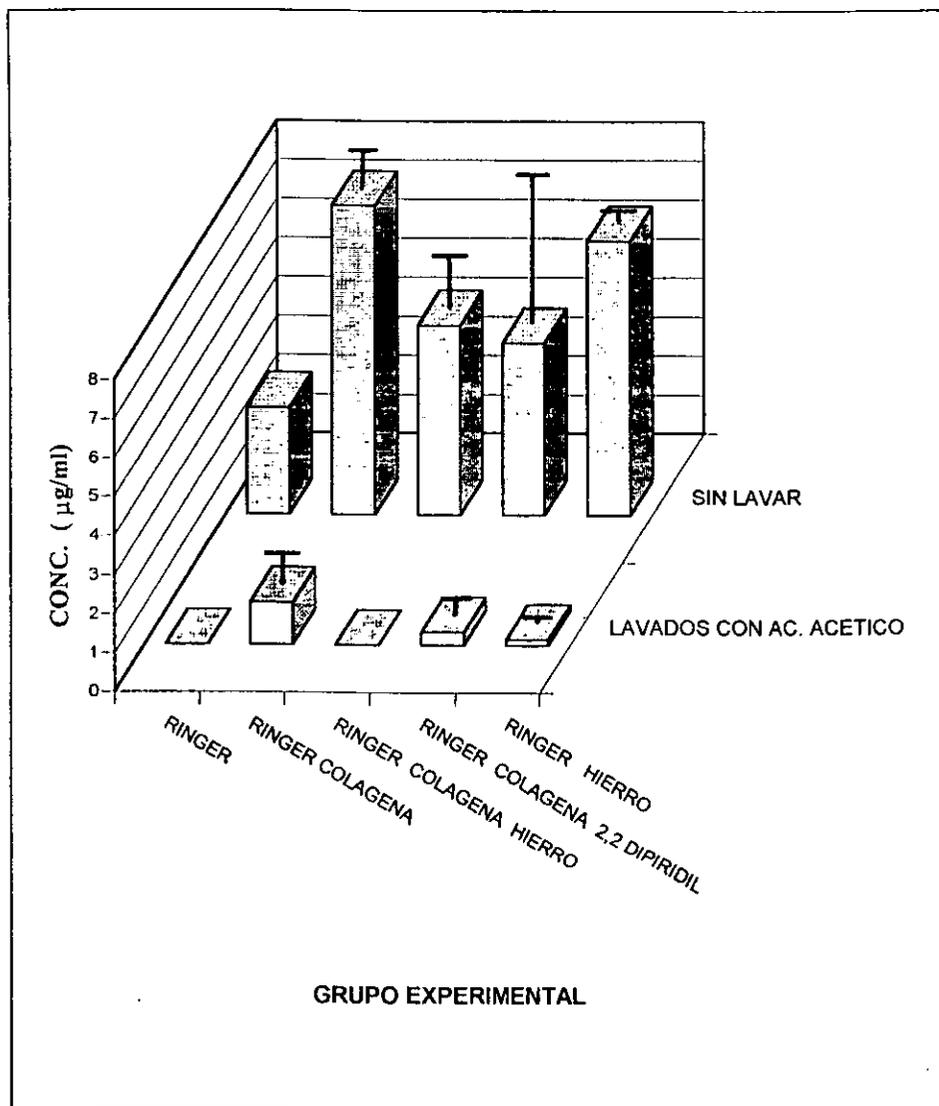
El ensayo Csaky también se aplico a los GED extraídos de los distintos grupos experimentales al final de las cinéticas. Una parte de cada muestra era tratada con ácido acético (para eliminar colágena) y la otra parte no era tratada, finalmente todas las muestras fueron resuspendidas en solución Ringer, y se aplico el ensayo Csaky, las concentraciones de hidroxamatos obtenidas fueron graficadas (Gráfica 3).

Para saber si existían diferencias entre los grupos, se aplicaron pruebas de anova de un factor con un nivel de significancia (α 0.05).

En los GED no tratados con ácido acético, los grupos Ri, Ri-Co-Fe y Ri-Co-Dip, eran iguales entre sí, lo mismo sucedió entre Ri-Co y Ri-Fe, estos últimos grupos tenían las concentraciones más altas de hidroxamatos en GED, y si recordamos en estos mismos grupos (Gráfica 2) también se encuentran las concentraciones más altas de hidroxamatos en los sobrenadantes.



Gráfica 2. Medición de la concentración de hidroxamatos por medio del ensayo Csaky
En los sobrenadantes de los medios de cultivo de los distintos grupos
experimentales.



Gráfica 3. Comparación de las concentraciones de hidroxamatos en GED por medio del ensayo Csaky.

Entre los grupos de GED sometidos a lavado con ácido acético (Gráfica 3) no existían diferencias en las concentraciones de hidroxamatos entre los distintos grupos. Se observó que el ácido acético reduce la concentración de hidroxamatos de manera uniforme.

PROTEINAS EN GED.

De los distintos grupos experimentales, se determinó en GED el contenido de proteínas totales. Para saber si existían diferencias en la producción de proteínas se utilizó una prueba de anova de un factor con un nivel de significancia ($\alpha = 0.05$), el análisis estadístico indicó que no existían diferencias en la producción de proteínas en GED. El promedio fue de 67.974 $\mu\text{g} / \text{ml}$.

DISCUSION

Inicialmente se ensayaron cinéticas de activación, con períodos de 22, 24 y 28 hrs., para dar tiempo a que *E. histolytica* alcance la fase estacionaria, debido a que en esta, se han reportado las máximas producciones de sideróforos en otros microorganismos (Neilands J.B. 1984). Sin embargo la solución Ringer no era capaz de mantener a las células en estos lapsos de tiempo, estas se dañaban y morían, en este caso cualquier evidencia de la síntesis de sideróforos no es real, porque no se puede asegurar que esto sea un efecto de células vivas, o simplemente la interferencia de productos de la lisis celular o alguna causa desconocida. Se eligió realizar cinéticas con una duración de 8 hrs., debido a que amibas, en este lapso de tiempo se conservaban en buen estado y la viabilidad era cercana o ligeramente mayor al 100 % (+/- 7 %), así se tenía la certeza de que cualquier efecto era causado por células vivas, además como el número de amibas se mantenía mas o menos constante, en este lapso tiempo, las células estaban en fase estacionaria, que es la ideal para este tipo de ensayos. Seguramente la solución Ringer debido a que solo contiene tres cloruros (Na, K y Ca) no proporciona a las células los nutrientes necesarios (como hierro, fosfatos, carbohidratos, etc.) para que estas se desarrollen y reproduzcan, por lo que las amibas se ven forzadas a parar su reproducción, entrando a una fase estacionaria que se prolonga por 10 hrs., después de este tiempo el número de células baja.

Con respecto a la alta mortalidad presentada en el grupo Ri-Co-Dip, tal vez se pueda explicar como consecuencia de que al ser el 2,2 dipiridil un quelador de hierro afecto las vías metabólicas de *E. histolytica* dependientes de hierro, al respecto se han probado fármacos

con propiedades queladoras de hierro, como la 8-hidroxiquinoleína y compuestos relacionados, demostrándose que la quelación está relacionada con la actividad antimicrobiana por lo menos a nivel *in vitro*; se cree que algunos queladores forman compuestos con iones metálicos y pueden privar al microorganismo de nutrientes esenciales; otra forma propuesta es que algunos queladores como los dietil carbamatos y 8-hidroxiquinoleínas al formar compuestos con iones metálicos penetran más fácilmente al organismo y estando dentro de la célula puede darse el caso de que el sideróforo esté presente en forma libre y como un complejo quelador : metal, el sideróforo liberado va a estar dentro de la misma célula privándola del hierro necesario para su metabolismo además de que puede atrapar otros metales como el cobre, también necesario para la célula (Taylor R.G. y O'Connell L.S. 1987).

Con respecto al ensayo CAS para la detección de hierro, éste no fue el método más apropiado para cuantificar hierro en los sobrenadantes de las cinéticas de activación, hasta ahora no está reportado que alguna de las sales de la solución Ringer o la colágena que pudiera estar presente, afecten de alguna manera el ensayo, sin embargo la prueba dio resultados repetibles al medir el contenido de hierro en GED, se debe de hacer notar que los GED se obtienen libres del medio de cultivo, en este caso parece ser que los medios de cultivo no influyen el contenido de hierro en GED, solamente el grupo Ri-Fe tenía concentraciones más altas que los otros grupos (Gráfica 1) y como su contraparte Ri-Co-Fe era igual a los demás grupos con respecto al contenido de hierro en GED, es posible que la colágena pueda atrapar hierro, pero no existen reportes que apoyen esto.

En cuanto al contenido de hierro en GED parece ser que la cantidad de hierro presente en general se mantiene igual con promedio de 4.7 mg/ml, con esto seguimos confirmando que el hierro es un componente de los GED (León G. et al 1997).

Los sideróforos están ampliamente distribuidos en especies microbianas aeróbicas y anaerobias facultativas. La lista de microorganismos conocidos que producen sideróforos incluyen varias bacterias entericas; bacterias y fungi patógenos de humanos, animales y plantas; microorganismos del suelo; especies gram negativas y positivas; algas verde azules (*Cyanobacteria*) y algas superiores; bacterias fijadoras de nitrógeno; y muchos tipos de fungi, incluyendo todas las especies de *Penicillium*, *Neurospora*, Basidiomicetes y ciertos tipos de levaduras (J.B. Neilands 1984).

En el presente trabajo se logró detectar la producción de sideróforos en *E. histolytica* por lo menos químicamente, a este respecto, debemos hacer notar: En ningún protozooario se ha podido comprobar la producción de sideróforos, por lo que ésta es la primera vez, inaugurando un nuevo campo de trabajo. Esto a su vez puede motivar la investigación hacia la detección de sideróforos en otras especies de protozoarios.

E. histolytica desde hace un buen tiempo era un candidato idóneo, para intentar detectar sideróforos, ya que es un organismo patógeno con altos requerimientos de hierro, y debido a que se tiene conocimiento que varios microorganismos invasores poseen sistemas de captación de alta afinidad al hierro (sideróforos), y que estos están estrechamente relacionados a la patogenicidad, *E. histolytica* cumplía este requisito, además como se menciona

al principio, la regulación de la expresión de la Superóxido Dismutasa era parecida a la de *E. coli* (Bruchhaus I. y Tannich E. 1994), entonces había similitudes entre los dos parásitos en la regulación del hierro tal vez *E. histolytica* posea sideróforos. Estos dos puntos de vista en un principio motivaron la investigación en este campo.

Nosotros pensamos que parte de los intentos, que no lograron detectar sideróforos en *E. histolytica* se pudieron deber a que al montar el ensayo CAS, los investigadores esperaban que las pruebas positivas originaran tonalidades naranjas o amarillas; sin embargo pruebas positivas pueden dar lugar a tonalidades grises (comunicación personal Dr. José de Jesús Serrano) y en este trabajo se pudo demostrar que tonalidades rosadas y violetas son producidas cuando la concentración de sideróforos que reacciona con solución ensayo CAS se mantiene arriba de 0.15 mM, y debido a que el ensayo CAS es independiente de la estructura del sideróforo (Schwyn B. y Neilands J.B. 1987) es posible que otros sideróforos se comporten igual, pero es necesario hacer más pruebas con otros sideróforos.

Para tratar de explicar como se originan estas tonalidades citaremos a Langmyhr E.J. y Klausen K.S. (1963), ellos reportaron que la molécula CAS puede adoptar varias tonalidades, dependiendo del número de hidrógenos extras incorporados a la molécula, así tenemos que la tonalidad azul no tiene H extras (Ch^4), la amarilla tiene un H (HCh^3), rojo dos H (H_2Ch^2), naranja tres H (H_3Ch^1) y la tonalidad rosada puede tener 4 o 5 hidrógenos extras (H_4Ch o H_5Ch^{+1}). Como se puede notar las tonalidades rosa tiene mayor número de hidrógenos incorporados cuando un sideróforo incorpora Fe, existe una liberación de H (Hider R.C. 1984) las ecuaciones correspondientes se presentan en la

pagina 5, debido a que el reactivo CAS cede Fe al sideróforo este tipo de reacciones se presentan, por lo tanto es posible que estos H se incorporen a la molécula CAS, y entre mayor sea la concentración de sideróforo existirán mas H disponibles y se presentaran tonalidades Rosas y viceversa con las tonalidades amarillas y naranjas. En nuestro caso la tonalidades Rosas se daban a concentraciones arriba de 0.15 mM y las tonalidades azules, amarillas y naranjas se presentaban en un intervalo de 0 a 0.015 mM (Schiwyn B. y Neilands J.B. 1984) por lo tanto existen cierta correspondencia, sin embargo hay que reconocer que esta hipótesis se debe demostrar.

Otra manera de liberar H seria reduciendo el pH, pero debido a que el amortiguador piperazina anhidra forma parte de la solución CAS se descarta que el reactivo por si solo tuviera influencia en el cambio de tonalidad, además que se fue muy estricto al usar esta solución, para evitar errores debido al mal estado de la misma.

Desafortunadamente no existe otro protozoario que produzca sideróforos para poder realizar comparaciones con respecto a nuestro trabajo. De los microorganismos productores de sideróforos, las bacterias patógenas entericas serian lo más cercano a *E. histolytica*, sin embargo no podríamos usarlas como parámetro para ver si la producción de sideróforos es alta o baja, por las siguientes razones: El tamaño promedio de las bacterias es de 2 μ y el de las amibas 25 μ (Martínez-Palomo A. 1989), doce veces más que las bacterias, por lo tanto no se puede comparar directamente la producción sideróforos entre amibas y bacterias; no conocemos la estructura del sideróforo, esto nos ayudaría a saber si es producido por otro microorganismo, por ejemplo la aerobactina es producida por varias bacterias, en el mismo

caso se encuentra la enterobactina (Neilands J. B. 1984), y si no fuera este caso se podría buscar algún sideróforo con estructura parecida para tratar de hacer alguna comparación.

Debido a que la producción de proteínas en GED es igual en todos los grupos experimentales, es posible que la colágena no tenga ningún efecto sobre la producción de proteínas en GED, en estas condiciones experimentales, ya que la producción se mantiene igual, aun en presencia o ausencia de colágena. En cambio el calcio que estuvo presente en la misma concentración en todos los grupos experimentales, puede ser el factor que estimula la producción de proteínas en GED.

Como ya observamos en las gráficas 2 y 3 todos los grupos experimentales producían hidroxamatos, este comportamiento se podría deber a que la producción y secreción de sideróforos tenga una regulación parecida a la presente en GED, en estos siempre es posible detectar GED, pero cuando se da interacción con Colágena tipo I y calcio, va a existir un incremento en la síntesis de GED (Muñoz M. L. et al 1990); y como los hidroxamatos también se detectaron en GED, tal vez estén asociados a estos, y los sideróforos sean uno más de los productos que transportan los GED; a consecuencia de esto se esperaría que siempre existiera producción de sideróforos y esta síntesis se incrementara con concentraciones de hierro bajas además de la presencia de calcio. De ninguna manera sería un desperdicio producir continuamente sideróforos, recordemos que en condiciones normales el pH en intestino delgado y grueso tiene un intervalo de 6.89 - 7.51 (Schutz S.G. et al 1989) y el hierro es insoluble a estos pHs, además existen proteínas como la lactoferrina que secuestra el hierro (Neilands J.B. 1984), por lo que el medio ambiente que

encuentra inicialmente *E. histolytica* es pobre en hierro, y en estas condiciones producir continuamente sideróforos sería una ventaja.

Es lógico pensar que como los sideróforos poseen una parte péptida, al existir diferencias en la producción de estos en los grupos experimentales estas diferencias también se verían reflejadas en la producción de proteínas en GED, sin embargo no es el caso. Para explicar esto, recordemos que el ensayo Csaky es una prueba semicuantitativa y utilizamos el sideróforo Desferal como estándar, en este caso solo tenemos una idea aproximada de la cantidad de hidroxamatos, para saber la cantidad exacta de hidroxamatos deberíamos tener aislado nuestro sideróforo y usarlo como estándar en este ensayo; además la parte péptida de un sideróforo varía, en cuanto a composición y contribución al peso total de la molécula, dependiendo del sideróforo que se trate, y debido a que obtuvimos en GED concentraciones de hidroxamatos con un intervalo de 2.7 a 7.9 mg/ml al, compararlos con el promedio de producción de proteínas en GED (67.974 mg/ml), es muy posible que estas cantidades no produzcan diferencias significativas en sus respectivos grupos experimentales. También se debe de recordar que los GED en su composición, están formados por varios polipéptidos, con pesos moleculares que van de un intervalo de 26 a 149 Kilodaltones (KDa), además de otras moléculas (León G. et al 1997), en cambio los sideróforos tienen pesos moleculares con un intervalo de 500 a 1000 Daltones (Da) (Neilands J.B. 1981), por lo tanto para aumentar el número de moléculas de sideróforo disponibles, no es necesario incrementar de manera notable el peso de los GED, además de que los sideróforos pueden reciclarse (Hider R.C. 1984)

Enseguida analicemos el comportamiento de cada grupo experimental con respecto a la concentración de hidroxamatos.

El grupo Ri-Co respondió a nuestras expectativas, fue uno de los grupos experimentales que tuvo las concentraciones más altas de hidroxamatos tanto en GED (Gráfica 3) y en los sobrenadantes de los medios (Gráfica 2), recordemos que tenía concentraciones bajas de hierro, y estaba presente el ion el calcio, ya se ha hablado repetidamente como estos factores podrían intervenir en la producción de sideróforos.

Si observamos la gráfica 3, podemos observar que en los GED el grupo Ri tiene bajas concentraciones de hidroxamatos, a comparación con el grupo Ri-Co; de esta manera se puede ver que la colágena tal vez incrementa la producción de hidroxamatos, desgraciadamente no se pudo medir el contenido de hidroxamatos en los sobrenadantes de este grupo, y por el momento no conocemos su comportamiento en este caso, contrario a los demás grupos que tanto en las gráficas 2 y 3 tienen un comportamiento parecido. De esta manera, la influencia de la colágena sobre el incremento de la síntesis de GED debe ser objeto de un estudio más detallado

Respecto al grupo Ri-Co-Dip este presenta una mortalidad muy alta, y como lo explicamos al principio de la discusión, los resultados en este grupo no son confiables además de que el 2,2 dipiridil puede afectar a *E. histolytica*, por lo que este grupo queda descartado.

El grupo Ri-Co-Fe tiene las concentraciones más bajas de hidroxamatos en los sobrenadantes de los medios (Gráfica 2) y en cuanto al contenido de hidroxamatos en GED (Gráfica 3) este grupo no entra entre los que tuvieron las concentraciones más altas y como lo explicamos, antes posiblemente siempre existe síntesis de sideróforos, pero en este caso no se dispara la síntesis. Si recordamos que el contenido de hierro en GED (Gráfica 1) en los dos grupos con hierro, el que contenía colágena poseía una menor concentración de hierro, de aquí se deduce que la colágena atrapa el hierro; por lo tanto si la amiba fagocita colágena también incorporaría hierro, de esta manera sería innecesaria la síntesis de sideróforos.

El grupo Ri-Fe a pesar de contener hierro, fue uno de los grupos con mayores concentraciones de hidroxamatos (Gráfica 2 y 3), de acuerdo con lo explicado debería ser lo contrario. Por el momento no está reportado que el hierro o alguna de las sales de la solución Ringer afecte de alguna manera el ensayo Csaky, en este grupo no hubo problemas con la viabilidad de las amibas. Una posible explicación sería que debido al pH 7 de la solución Ringer el hierro presente estaría en un estado de oxidación de +3 siendo muy insoluble (Sánchez Salas J.L. 1990), por lo cual la amiba no lo puede asimilar directamente y es necesario producir sideróforos.

Los experimentos nos indicaron que de todos los medios de mantenimiento ensayados, el formado por Ringer-Colágena, parece ser el candidato idóneo, para el aislamiento e identificación del sideróforo, por las siguientes razones: 1) el contenido de hierro en este es bajo, y como se ha mencionado repetitivamente, las bajas concentraciones de hierro provocan la producción de sideróforos; 2) la viabilidad de las amibas es bastante

buena, lo que garantiza resultados confiables; 3) fue el grupo experimental que tuvo las concentraciones más altas; 4) las gráficas obtenidas en este medio son similares en distintos ensayos.

La máxima concentración de sideróforos detectada en este medio, se dio en el lapso de 4 a 6 hrs., por lo que para obtener, una buena producción, lo conveniente es recuperar las células pasadas 6 hrs. y usar este sobrenadante para obtener sideróforos. A pesar de que en los GED pudieran contener sideróforos, no es recomendable aislarlos de aquí, ya que los GED poseen varios polipeptidos (León G. et al 1997), lo cual haría difícil la extracción.

Podemos mencionar que si existiera el sideróforo, tal vez sea enviado al medio exterior vía los GED; como los GED contienen en su composición varios elementos químicos y péptidos, destacando la enzima colagenasa; los GED actúan como un medio para la secreción de estos componentes (Muñoz M.L. et al 1982 y 1994, León G. et al 1997). Debido a que se pudieron detectar sideróforos en los GED, posiblemente también sean componentes de éstos, y por lo tanto, se liberen al medio exterior junto con los GED.

También se sabe que los GED tienen hierro en su composición (León G. et al 1997), y como hemos visto este es el elemento sobre el cual actúan los sideróforos, este hecho apoya en parte la suposición de que los sideróforos formen parte de los GED, ya que tal vez el hierro presente este unido a estas moléculas.

Gracias al ensayo Csaky se pudo demostrar que el sideróforo producido por *E. histolytica* es del tipo hidroxamato; en este tipo de sideróforo se detectó, tanto en GED y los sobrenadantes de los distintos grupos experimentales.

Es posible que la naturaleza química del sideróforo detectado en *E. histolytica* pueda representarle alguna ventaja al parásito, a la hora de iniciar la invasión a su hospedero. A continuación apoyaremos esta afirmación.

E. coli produce dos tipos de sideróforos: La enterobactina del tipo catecol y la aerobactina del tipo hidroxamato, los dos pueden remover hierro de la transferrina, pero la adición de albúmina humana a la solución de hierro-transferrina y enterobactina resultó en una inhibición de la transferencia de hierro; en cambio la adición de albúmina humana, no afectó la transferencia de hierro cuando el ligando era la aerobactina. Debido a que la enterobactina posee un carácter aromático (todos los catecoles tienen por lo menos un anillo benzenico) se une con la albúmina, y esta puede unirse a una gran cantidad de ligandos hidrofóbicos, las drogas unidas a la albúmina, afectan su transporte entre tejidos y órganos y su concentración efectiva, la unión también protege contra los efectos tóxicos de los ligandos atrapados. La albúmina unida a otras proteínas del plasma, está distribuida a través de la mayoría de los fluidos extracelulares del cuerpo, tanto en los compartimientos intravasculares y extravasculares. El paso de la albúmina a los fluidos intersticiales, hace que esta proteína esté disponible para todas las células y extienda su efecto protector a un número de compuesto potencialmente tóxicos, entre ellos la enterobactina. La virulencia de *E. coli* depende en mayor grado de la aerobactina, ya que no tiene una afinidad detectable

para la albúmina y puede actuar como un mediador de la entrada de hierro, de la transferrina hacia la bacteria, aún en presencia de proteínas del suero (Kanopka K. y Neilands J.B. 1984). Otro trabajo vino a confirmar esto último, en cepas de *E. coli* que producían el sideróforo aerobactina, presentaban resistencia a la fagocitosis y poseían una virulencia más marcada, que las cepas sin aerobactina, en modelos murinos de bacteremia; en cambio no existía ninguna relación entre la producción de enterobactina y la virulencia de *E. coli* (Montgomerie J.Z. et al 1984).

Habiendo revisado lo anterior y conociendo algunas de las características peculiares de la amibiasis humana invasiva como serían: Es altamente destructiva, causa una rápida y extensa necrosis y licuefacción de todos los tejidos atacados por el parásito; estimula una respuesta inflamatoria pequeña y localizada, especialmente cuando se le compara con la extensión de daño de los tejidos; las regiones de tejido extensamente destruidas, están acompañadas por hemorragias severas (Pérez-Tamayo R. et al 1990).

Como consecuencia de la inflamación, en una infección por *E. histolytica*, habría una vasodilatación, originando la salida de la circulación de células y proteínas entre ellas la albúmina, transferrina y lactoferrina, originando, principalmente un aumento de albúmina en los sitios de inflamación; además las hemorragias producidas por el parásito, también ayudan a que aumente notoriamente la liberación de proteínas de la circulación sanguínea, destacando la albúmina y la transferrina, esta última como lo explicamos anteriormente puede ser una fuente de hierro. Por lo tanto en este medio, un sideróforo del tipo catecol, tendría problemas para desempeñar sus funciones, y gracias a que *E. histolytica* produce hidroxamatos, la captación de hierro no podría ser afectada.

La fagocitosis es una propiedad de *E. histolytica* estrechamente relacionada con la virulencia. Después de que la citólisis por contacto de células blanco ocurre, las amibas patógenas ingieren las células lisadas, sin embargo también pueden envolver células vivas. En general las cepas patógenas presentan una alta tasa de eritrofagocitosis; en contraste amibas no patógenas y aquellas con virulencia atenuada, ingieren pocos eritrocitos. La ingestión de glóbulos rojos por amibas patógenas constituye un proceso rápido y eficiente (Martínez-Palomo A, González A. y Chávez B. 1990). Por lo tanto, se podría pensar que el proceso fagocítico de *E. histolytica*, aportara el hierro necesario para satisfacer las necesidades del parásito, esto pensando que el 75% del hierro en el cuerpo humano esta localizado intracelularmente como hemoglobina. Y por lo tanto esto nos llevaría a pensar que un sistema de captación de hierro por medio de sideróforos seria innecesario, sin embargo en otros parásitos se han encontrado sistemas alternos de captación de hierro además de un sistema del tipo sideróforo. A continuación citaremos los ejemplos.

Bajo condiciones de limitación de hierro *Vibrio cholerae* el causante del cólera, sintetiza y secreta un sideróforo llamado vibriobactina que ha sido relacionado con la patogenia, además de producir una hemolisina que puede lisar eritrocitos y otras células eucarionticas, liberando complejos que contienen grupo hemo, es posible que los compuestos liberados que contienen heme, puedan servir como una fuente de hierro, ayudando a *V. cholerae* a establecer una infección. Al realizarse estudios sobre como pueden influir estos sistemas de captación de hierro en la virulencia del parásito, los resultados obtenidos indicaron, que tanto la pérdida de la utilización de hemo y el sistema de entrada por vibriobactina, reduce la habilidad del organismo para colonizar el intestino y causar

enfermedad, particularmente cuando el inoculo es de tamaño reducido. La cepa de tipo silvestre era hábil para sobrevivir en el intestino y en muchos casos presentaba la máxima multiplicación, además de que el número registrado de cada mutante (con un sólo sistema de transporte) fue significativamente más bajo. Cuando los dos sistemas estaban ausentes, la habilidad del parásito para colonizar el intestino se reducía intensamente. De esta manera existe una relación entre la habilidad para adquirir hierro por el uso del sistema sideróforo o el sistema de utilización de hemo y la facilidad de *V. cholerae* para causar enfermedad. Estos datos sugieren que la utilización del sistema hemo o el sistema de entrada por vibriobactina, puede servir como un sustituto cuando el otro sistema es incapaz de transportar el hierro, pero la máxima virulencia requiere la expresión de los dos sistemas (Henderson D.P. y Payne S.M. 1994).

Algunas cepas de *E. coli* poseen la habilidad de sintetizar una hemolisina; muchos estudios han presentado que una alta proporción de aislados de *E. coli* de todos los sitios de infección extraintestinal en el hombre son hemolíticos, además de que las cepas hemolíticas son más virulentas en ratones y ratas que las cepas no hemolíticas o mutantes; y debido a que *E. coli* puede obtener hierro de hem libre, las hemolisinas, no únicamente son citotóxicas, además aportan hierro a la bacteria (Griffiths E. 1985). Por lo tanto este es un sistema de captación alternativo a la captación por los sideróforos enterobactina y aerobactina presentes en *E. coli*.

Después de ver esta evidencia es muy probable que *E. histolytica* se comporte de la misma manera, es decir, todos los sistemas de captación de hierro deben de expresarse para

que se facilite la invasión del hospedero por parte del parásito. Debemos recordar que *E. histolytica* habita el intestino grueso, y como el pH presente en este tiene un intervalo de 6.89 - 7.51 (Schultz S.G. et al 1989) el hierro tiene un estado de oxidación de +3, siendo muy insoluble, además de que el hierro presente en estos ambientes está unido a proteínas como la lactoferrina, por lo que el hierro disponible disminuye bastante. La misma situación se presentaría en *V. cholerae* y *E. coli*. Que son bacterias entericas, que como ya revisamos, tienen sideróforos y hemolisinas, que ayudan a la captación de hierro, en consecuencia no es de extrañar que *E. histolytica* resuelva parte de la escasez del hierro con la producción de sideróforos, complementando la lograda por la fagocitosis.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

CONCLUSIONES

Este es el primer trabajo donde se reporta la presencia al menos químicamente de un sideróforo en un protozooario, lo cual abre una puerta de estudios y apoya la idea de que los sideróforos son importantes para casi cualquier microorganismo patógeno.

El cambio de tonalidad en el ensayo CAS para la detección de sideróforos está relacionado con la concentración del sideróforo e hipotéticamente con la liberación de H del sideróforo y posterior incorporación del H a la molécula CAS.

Fue posible detectar la producción de sideróforos en los sobrenadantes de los medios de cultivo de *E. histolytica*, al igual que en los GED producidos por éste parásito. El sideróforo detectado pertenece al grupo de los hidroxamatos.

Se sigue confirmando que al igual que en otros microorganismos, en *E. histolytica* el aumento de la síntesis de hidroxamatos es estimulado por la baja disponibilidad de hierro en el medio. Todavía no queda muy claro si la colágena también es un factor que estimule la síntesis de hidroxamatos.

La máxima producción de hidroxamatos en *E. histolytica* se dio en el medio que contenía colágena tipo I y calcio.

El calcio parece ser el factor que estimula la producción de proteínas en GED.

El ensayo CAS para la detección de hierro no es el método más adecuado para cuantificar hierro en los sobrenadantes de estos experimentos, sólo fue útil para conocer la cantidad de hierro en GED

Se confirmó que los GED contienen hierro, y sus concentraciones se sitúan en un promedio de 4.7 mg/ml.

PERSPECTIVAS

Es necesario que en posteriores trabajos se estudie más a fondo, si la colágena también participa en el incremento de la síntesis de hidroxamatos, además de ensayar medios en los cuales el hierro este presente en un estado de oxidación de +2 para poder tener un parámetro de comparación, con respecto a otros medios con hierro escaso o insoluble.

Como ya se sabe la expresión de la máxima patogenicidad, requiere de un adecuado suministro de hierro, es probable que al suprimir en *E. histolytica* la producción de sideróforos, tal vez afecte al parásito, en cuanto a su capacidad para invadir el intestino, aunque no podemos afirmar que al realizar esto, el parásito pierda totalmente su virulencia.

El sideróforo de *E. histolytica*, puede ser blanco para el diseño de fármacos contra la amiba. Varios métodos han sido sugeridos para el desarrollo de antibióticos basados en sideróforos y análogos. Queladores muy efectivos pueden privar a los microbios patógenos del hierro esencial para su desarrollo. Esto puede ser acompañado por la quelación competitiva del hierro o por el bloqueo del sitio de unión al receptor del hierro con un sideróforo análogo no funcional o el sustrato del sideróforo natural unido a otro metal metabólicamente menos útil. Alternativamente, la fijación directa de componentes letales a sideróforos pueden dar lugar a una nueva forma de liberar fármacos, que utiliza el sistema de transporte de hierro del mismo organismo patógeno. Otro modo de acción, la generación de

radicales hidroxilo mediada por hierro puede inducir daño al DNA microbiano (Miller M.J. 1989).

Es necesario determinar la estructura química de este sideróforo del tipo hidroxamato, se recomienda utilizar un bioensayo con alguna cepa que detecte específicamente hidroxamatos, para dar por concluida la primera fase de este trabajo, posteriormente se pueden hacer estudios de regulación de la producción del sideróforo y su relación con la patogenia del parásito.

Como podemos ver, se abrió un nuevo campo de trabajo, y no solo en *E. histolytica*, también es posible que se motive la investigación hacia otros protozoarios parásitos.

REFERENCIAS

- Arnow, L.E. 1937. Colorimetric determination of the components of 3,4 dihidroxifenilalanine-tirosine mixtures. J. Biol. Chem. 118: 531-537.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry. 72: 248-254.
- Bruchhaus I. y Tannich E. 1994. Induction of the iron-containing superoxide dismutase in *Entamoeba histolytica* by a superoxide anion-generating system or by iron chelation. Molecular and Biochemical Parasitology. 67 281-228.
- Cox C. D. 1994. Deferration of laboratory media and assay for ferric and ferrous ions. Methods in Enzymology. 235: 315-329.
- Csáky T. Z. 1948. On the estimation of bound hydroxylamine in biological materials. Acta Chi. Scand. 2: 450-454.
- Diamond L.S., Harlow D.R., Phyllips B.P. y Keister D.B. 1978. *Entamoeba histolytica*: iron and nutritional immunity. Arch. Invest. Med. 9 (Supl. 1): 329-338.
- Elsdow-Dew R. 1949. Endemic fulminant amebic dysentery. Am. J. Trop. Med. 29:337.
- Gillam A. H., Lewis A. G. y Andersen R. J. 1981. Quantitative determination of hydroxamic acids. Anal. Chem. 53: 841-844.
- Griffiths E. 1985. Candidate virulence markers. pp 194. In The virulence of *Escherichia coli*. Edited by M. Sussman. Academic Press.
- Henderson D. P. y Payne S. M. 1994. *Vibrio cholerae* iron transport systems: Roles of heme and siderophore iron transport in virulence and identification of a gene associated with multiple iron transport systems. Infection and Immunity. 62: 5120-5125.
- Hider R. C. 1984. Siderophore mediated absorption of iron. Struc. Bonding 58: 25-87.
- Hohnadel D. y Mayer J. M. 1988. Specificity of pioverdine-mediated iron uptake among fluorescent *Pseudomonas* strains. J. Bacteriology. 170: 4865-4875.

- Kretschmer R. R. 1994. Amibiasis Infeccion y Enfermedad por *Entamoeba histolytica*. Edit. Trillas. México D.F.
- Kanopka K. y Neilands J. B. 1984. Effects of serum albumin on siderophore-mediated utilization of transferrin iron. *Biochemistry*. 23: 2122-2127.
- Kühn S., Braun V. y Köster W. 1996. Ferric Rhizoferrin uptake into *Morganella morganii*: Characterization of genes involved in the uptake of a polyhydroxycarboxilate siderophore. *J. Bacteriology*. 178: 496-504.
- Langmyhr F. J. y Klausen K. S.. 1963. Complex formation of iron-(III) with chrome azurol S. *Anal. Chi. Acta* 29: 149-163.
- Lautour N.G. y Reeves R.E. 1965. An iron-requeriment for growth of *Entamoeba histolytica* in culture and the antiamebal activity of 7-iodo-8-hydroxy-quinoline-5sulfonic acid. *Exp. Parasitol.* 17:203-209.
- Leippe M., Bahr E., Tannich E. and Horstmann R. D. 1993. Comparison of pore forming peptides from pathogenic an nopathogenic *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 59: 101-110.
- Leippe M., Ebel S., Schoenberger O. L., Horstmann R.D. and Müller-Eberhard H. J. 1991. Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 7659-7663.
- León G., Fiori Ch., Das P., Moreno M., Tovar R., Sánchez-Salas J.L., and Muñoz M.L. Electron probe analysis and biochemical characterization of electron-dense granules secreted by *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 85: 233-242.
- Martínez-Palomo A. 1989. Amibiasis. Edit. Panamericana, México D. F.
- Martínez-Palomo A., González-Robles A. y Chávez B. 1990. Cell biology of the cytopathic effect of *Entamoeba histolytica*. pp 43. In *Amebiasis: Infection and disease by Entamoeba histolytica* . Edited by R.R. Kretschmer. CRC Press.
- Meza I., Haydee K. y Meraz. A. 1990. Molecular organization of *Entamoeba histolytica*. pp19. In *Amebiasis: Infection and disease by Entamoeba histolytica* . Edited by R.R. Kretschmer. CRC Press.
- Miller M. J. 1989. Syntheses and therapeutic potential of hidroxamic acid based siderophores and analogues. *Chem. Rev.* 89:1563-1579.
- Monfort I., Pérez-Tamayo R., González A., García M.C., Olivos A. and Tello E.. 1993. Role of cysteine proteinases of *Entamoeba histolytica* on the cytopathogenicity of axenic trophozoites on the rat an hamster hepatocytes in vitro. *J. Parasitol.* 79: 98-105.

- Montgomerie J. Z., Bindereif A., Neilands J. B., Kalmanson G. M. y Guzue L. B. 1984. Association of hydroxamate siderophore (Aerobactin) with *Escherichia coli* isolated from patients with bacteremia. *Infection and Immunity*. 46: 835-838.
- Muñoz M. L., Calderon J. and Rojkind M. 1982. The collagenase of *Entamoeba histolytica*. *J. Parasitol.* 155: 42-51.
- Muñoz M. L., Lamoyi E., León G., Tovar R., Pérez García J., de la Torre M., Murueta E. y Bernal R. M. 1990. Antigens in electron dense granules From *Entamoeba histolytica* as possible markers for pathogenicity. *J. Clin. Microbiology*. 28: 2418-2424.
- Muñoz M.L., Serrano J. J., Garza M., Moreno M. A., Tovar R., León G. y Tsutsumi. V. 1994. *Entamoeba histolytica* Electron-dense granulesecretion, collagenase activity and virulence are altered in the cytoskeleton mutant BG-3. *Molecular Microbiology* 11: 787-792.
- Neilands J. B. 1981. Microbial iron compounds. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 715-731.
- Neilands J.B. 1984. Methodology of siderophores. *Struc. Bounding* 58: 1-24.
- Neilands J. B. 1993. Siderophores. *Arch. Biochem. Biophys.* 302: 1-3.
- Neilands J.B. 1994a. Effects of iron deprivation on outer membrane protein expression. *Methods in Enzymology*. 235: 344-352.
- Neilands J. B. 1994b. Identification and isolation of mutants defective in iron acquisition. *Methods in Enzymology*. 235: 352-356.
- Nishida H. 1970. Spectrofotometric determination of iron-(III) with chrome azurol S. *Jap. Analist.* 19: 221-226.
- O'brien I.G. y Gibson F. 1970. The structure of enterochelin and related 2,3-Dihidroxy-N-Benzoylserine conjugated from *Escherichia coli*. *Acta Biochem. Biophys.* 215:393-402.
- Payne S. M. 1994. Detection, isolation, and characterization of siderophores. *Methods in Enzymology*. 235: 329-344.
- Pérez-Tamayo R., Becker I., Monfort I. y Pérez-Montford R. Pathobiology of amebiasis. pp 123. In *Amebiasis: Infection and disease by Entamoeba histolytica*. Edited by R.R. Kretschmer. CRC Press.
- Saavedra-Lira E. y Perez-Montfort R. 1996. Energy production in *Entamoeba histolytica*. New perspectives in rational drug design. *Arch. Med. Res.* 27: 257-264.

- Sánchez Salas J. L. 1990. Fierro e Infección. Tesis de Examen Predoctoral. E.N.C.B. IPN. México D.F.
- Schultz S. G., Markhlouf G. M. y Rauner B. B.. 1984. The gastrointestinal system Vol II. Edit. Oxford University Press. USA Baltimore Maryland.
- Schwyn B. y Neilands J. B. 1986. Universal chemical assay for detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*. 160: 47-56.
- Smith J.M. y Meerovitch E. 1982. Specificity of iron requirements of *Entamoeba histolytica* en vitro. *Arch. Invest. Med.* 13 (Supl. 3): 63-69
- Smith M. H. 1969. Do intestinal parasites require oxygen?. *Nature* 223:1129-1132
- Stuart S. J., Greenwood K.T. y Luke R. K. J. 1980. Hydroxamate-mediated transport of iron controlled by colv plasmids. *J. Bacteriology* 143: 35-42.
- Taylor R.G. y O'Connel L. S. 1987. A simplified in vitro assay correlating amebicidal activity with chelation by 8-hidroxyquinoline and related compounds. *Arch. Invest. Med.* 18: 203-209.
- Weinbach E.C., Takeuchi T., Claggett C. E., Inohue F., Kon H. y diamond L. S. 1980. Role of iron-sulfur proteins in the electron transport system of *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med.* 11 (Supl. 1): 75-81.
- Weingberg E. D. 1978. Iron and infection. *Microbiological Reviews*. 42: 45-66.
- Weingberg E. D. 1984. Iron withholding? A defense against infection and neoplasia. *Physiological Reviews*. 64: 65
- Zaman V. 1982. Atlas de parasitología Medica. Edit. Panamericana. México D.F.